

**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI  
EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

**SKRIPSI**

Disusun untuk memenuhi sebagian syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
Program Studi Biologi



Oleh:

Siti Triani Rakhmirianti

NIM. 1604578

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN BIOLOGI  
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA**

**2020**

Siti Triani Rakhmirianti, 2020

**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

Universitas Pendidikan Indonesia | [repository.upi.edu](https://repository.upi.edu) | [perpustakaan.upi.edu](https://perpustakaan.upi.edu)

**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI  
EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

**Oleh  
Siti Triani Rakhmirianti**

**Sebuah Skripsi yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh  
gelar Sarjana Sains pada Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu  
Pengetahuan Alam**

**©Siti Triani Rakhmirianti 2020  
Universitas Pendidikan Indonesia  
Juli 2020**

**Hak cipta dilindungi undang-undang**

**Skripsi ini tidak boleh diperbanyak seluruhnya atau sebagian dengan dicetak  
ulang, difoto kopi, atau cara lainnya tanpa ijin dari penulis.**

**LEMBAR PENGESAHAN**  
**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI**  
**EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

Oleh:  
Siti Triani Rakhmirianti

**DISETUJUI DAN DISAHKAN OLEH:**

Pembimbing I, 30/2020



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.  
NIP. 197008112001122001

Pembimbing II,



Dr. Any Aryani, M.Si.  
NIP. 197105302001122001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Biologi,



Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si.  
NIP. 197008112001122001

## PERNYATAAN

*Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI Aeromonas hydrophila PATOGEN**” beserta seluruh isinya adalah karya saya sendiri dan tidak dilakukan adanya penjiplakan atau pengutipan yang tidak sesuai dengan aturan etika ilmu yang berlaku dalam masyarakat keilmuan. Atas pernyataan ini, saya siap menanggung resiko atau sanksi apabila di kemudian hari ditemukan adanya pelanggaran etika keilmuan atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya.*

Bandung, Juli 2020

Siti Triani Rakhmirianti

NIM. 1604578

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah subhanahu wa ta'alla, karena atas berkah nikmat, rahmat, dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**” yang diajukan sebagai salah satu syarat dan tugas akhir memperoleh gelar Sarjana Sains di Program Studi Biologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia. Skripsi ini terdiri dari lima bab dan disajikan dalam bentuk karya tulis ilmiah. Penulis menyadari bahwa masih banyak sekali kekurangan pada penelitian serta penulisan karya ilmiah ini, sehingga penulis memohon maaf atas kekurangan-kekurangan tersebut. Kritik dan saran sangat diharapkan oleh penulis dengan tujuan bisa menjadi lebih baik lagi. Penulis berharap bahwa hasil penelitian dari skripsi ini dapat bermanfaat bagi dunia pendidikan pada umumnya, terutama pada bidang keilmuan Biologi dan dapat dijadikan sebagai pustaka penelitian-penelitian selanjutnya.

Penulisan skripsi ini banyak melibatkan beberapa pihak yang mendukung dan memberikan bantuan, bimbingan, dan motivasi bagi penulis. Ucapan terima kasih penulis haturkan, khususnya kepada:

1. Ibu Dr. Hj. Diah Kusumawaty, M.Si., selaku dosen pembimbing I sekaligus ketua Program Studi Biologi yang telah membimbing, memberi masukan, serta motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
2. Ibu Dr. Any Aryani, M.Si., selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing, memberi masukan, serta motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi ini selesai.
3. Ibu Dr. Hj. Any Fitriani, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, masukan, serta motivasi kepada penulis selama awal perkuliahan hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Bambang Supriatno, M.Si., selaku Ketua Departemen Pendidikan Biologi yang telah memberikan kemudahan kepada penulis selama proses perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini.
5. Segenap dosen Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI atas segala ilmu, bimbingan, nasihat, serta fasilitas bagi penulis dalam menempuh pendidikan di bidang MIPA, terutama Biologi selama masa perkuliahan hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
6. Seluruh *staff* akademik beserta laboran Laboratorium Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI yang selalu membantu dalam memberikan fasilitas, bimbingan, dan berbagai kemudahan pada penulis sehingga dapat menunjang penulis dalam pembuatan skripsi ini.

7. Kedua orang tua penulis, Bapak Dr. Riandi, M.Si. dan Ibu Dra. Tati Hermawati, M.Si., atas kasih sayang, doa, dan bantuan secara moril maupun materil serta motivasi yang selalu dituturkan kepada penulis. Tak lupa bantuan dan motivasi dari kedua saudara penulis, Siti Prita Fitrianti dan Muhammad Rizfardi Metafiliana yang selalu membuat penulis semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Kakak senior Tina Yulianti dan Sylviani Aulia Rahma atas bantuan, bimbingan, dan semangat yang diberikan kepada penulis hingga penyusunan skripsi ini selesai.
9. Kepada Raffi Noersyah yang selalu menemani, memotivasi, dan memberikan semangat kepada penulis selama proses pembuatan skripsi hingga dapat diselesaikan tepat waktu.
10. Teman-teman Biologi C 2016 atas dukungan, keceriaan, dan semangat selama 4 tahun perkuliahan, terutama sahabat seperjuangan peneliti yaitu Annisa Martina Firdausa, Nuraini Mardiyah, Stella Melbournita Noor Augustine, dan Yusi Yustami.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuan dan motivasinya sehingga karya yang sederhana ini dapat terselesaikan.

Semoga Allah subhanahu wa ta'alla senantiasa membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Demikian skripsi ini penulis buat, terima kasih dan mohon maaf atas kesalahan serta kekurangan penulis. Semoga karya tulis ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi banyak orang.

Bandung, Juli 2020  
Penulis

Siti Triani Rakhmirianti

## DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN

### ABSTRAK

*Aeromonas hydrophila* merupakan *microbial flora* pada ikan air tawar yang dapat menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) apabila kondisi imun ikan menurun. *Aeromonas* memiliki taksonomi yang kompleks dengan karakter yang berbeda-beda di level intraspesies. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk optimasi dan perancangan desain primer multipleks untuk pendeteksian *Aeromonas hydrophila* patogen. Sampel bakteri yang digunakan yaitu *A. hydrophila* SI, *A. hydrophila* InaCC B464, *A. hydrophila* A2, *A. hydrophila*, *Streptococcus* sp. InaCC B571, dan *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Sampel *A. hydrophila* di validasi secara molekuler menggunakan PCR dengan 16s rRNA dan sembilan gen virulen pustaka *Aeromonas* (*alt*, *act*, *ast*, *aerA*, *pla/lip*, *ahyB*, *asc-FG*, *lip*, dan *hlyA*). Selanjutnya dilakukan uji *in silico* multipleks PCR pada primer gen virulen lalu dilakukan uji secara *in-vitro*. Hasil amplifikasi seluruh sampel dengan 16s rRNA menghasilkan ampikon 1.500 bp. Tujuh dari sembilan gen virulen teramplifikasi pada sampel *A. hydrophila*, enam di antaranya digunakan sebagai primer multipleks (mPCR-1: *act*, *alt*, *ast*; mPCR-2: *aerA*, *pla/lip*, *ahyB*). Hasil amplifikasi multipleks PCR untuk pendeteksian spesifik *Aeromonas hydrophila* patogen dapat menggunakan set primer mPCR-1 (*act* dan *ast*) dengan Ta 65°C dan kombinasi konsentrasi primer yang sama sebesar (0.3  $\mu$ M: 0.3  $\mu$ M: 0.3  $\mu$ M) serta set primer mPCR-2 (*aerA*, *pla/lip*, *ahyB*) dengan Ta 55°C dan kombinasi konsentrasi primer (0.2  $\mu$ M : 0.2  $\mu$ M : 0.25  $\mu$ M). Berdasarkan uji multipleks PCR, primer set mPCR-1 yang dirancang pada penelitian dapat digunakan sebagai solusi permasalahan amplifikasi.

**Kata Kunci:** *Aeromonas hydrophila*, *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS), Multipleks PCR

# MULTIPLEX PRIMER DESIGN AND OPTIMIZATION FOR EFFECTIVE DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA *Aeromonas hydrophila*

## ABSTRACT

*Aeromonas hydrophila* is a microbial flora in fresh water fishes that can cause Motile Aeromonas Septicemia (MAS) disease if the fish has a low immune. *Aeromonas* has a complex taxonomy with different characters at the intraspecies level. The aim of this study is to design and optimize multiplex primers for rapid detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *A. hydrophila* SI, *A. hydrophila* InaCC B464, *A. hydrophila* A2, *A. hydrophila*, *Streptococcus* sp. InaCC B571, and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  were used as bacterial test. Molecular assay were used to test the validity of *A. hydrophila* samples using PCR with 16s rRNA and nine *Aeromonas* virulent genes (*alt*, *act*, *ast*, *aerA*, *pla/lip*, *ahyB*, *asc-FG*, *lip*, and *hlyA*). The in silico multiplex PCR test was carried out then the in-vitro test was performed. The result of validity test with 16s rRNA showed all of the samples amplified an amplicon of 1,500 bp. Seven of nine virulent genes were amplified, six of them were used as multiplex primers (mPCR-1: *act*, *alt*, *ast*; mPCR-2: *aerA*, *pla/lip*, *ahyB*). The results of multiplex PCR amplification showed that mPCR-1 primer sets (*act* and *ast*) with Ta 65°C and the same combination primers concentration (0.3  $\mu$ M: 0.3  $\mu$ M: 0.3  $\mu$ M) also mPCR-2 primer sets (*aerA*, *pla/lip*, *ahyB*) with Ta 55°C and combination primers concentration (0.2  $\mu$ M: 0.2  $\mu$ M: 0.25  $\mu$ M) can be used. Based on the multiplex PCR test, the mPCR-1 primer set designed in the study can be used as a solution to the amplification problem.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, Motile Aeromonas Septicemia (MAS), Multiplex PCR



## DAFTAR ISI

<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	i
<b>PERNYATAAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Tujuan Penelitian.....	4
1.6 Manfaat Penelitian.....	4
1.7 Struktur Organisasi.....	4
<b>BAB II <i>Aeromonas hydrophila</i>, POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR), PERANCANGAN PRIMER MULTIPLEKS, ANALISIS Kuantitatif dan Kualitatif DNA</b> .....	6
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi dan morfologi <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	6
2.1.2 Habitat dan penyebaran <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
2.1.3 Penyakit MAS dan gejala penyerangan <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
2.1.4 Faktor virulen <i>Aeromonas</i> .....	7
2.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	9
2.2.1 Multipleks <i>PCR</i> .....	11
2.3 Perancangan Primer Multipleks.....	12
2.4 Analisis Kuantitatif dan Kualitatif DNA.....	13
2.4.1 Analisis kuantitatif DNA.....	13
2.4.2 Analisis kualitatif DNA.....	14

<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	16
3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	16
3.3 Alat dan Bahan.....	16
3.4 Prosedur Penelitian.....	16
3.4.1 Tahap persiapan.....	17
3.4.2 Tahap penelitian.....	17
3.4.2.1 Isolasi strain bakteri <i>Aeromonas</i> dan <i>non-Aeromonas</i> .....	17
3.4.2.2 Ekstraksi DNA <i>template</i> .....	17
3.4.2.3 Protokol <i>single PCR</i> menggunakan primer gen virulen.....	19
3.4.2.4 Pengujian multipleks <i>PCR</i> secara <i>in silico</i> .....	20
3.4.2.5 Optimalisasi protokol <i>two tube mPCR</i> .....	20
3.4.2.6 Perancangan desain primer multipleks gen virulen.....	21
3.4.3 Tahap analisis data.....	22
3.4.3.1 Analisis hasil multipleks <i>PCR</i> secara <i>in silico</i> dan <i>in vitro</i> .....	22
3.4.3.2 Analisis perbandingan primer multipleks secara <i>in silico</i> .....	22
3.5 Alur Penelitian.....	22
<b>BAB IV TEMUAN DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>25</b>
4.1 Hasil Ekstraksi DNA <i>Template</i> .....	25
4.2 Hasil Protokol <i>Single PCR</i> Menggunakan Primer Gen Virulen.....	27
4.3 Hasil Pengujian Multipleks <i>PCR</i> secara <i>in silico</i> .....	31
4.4 Hasil Optimalisasi Protokol <i>Two tube Multiplex PCR</i> .....	37
4.5 Hasil Perancangan Desain Primer Gen Virulen <i>A. hydrophila</i> Patogen.....	40
4.6 Analisis Multipleks <i>PCR</i> Identifikasi Spesifik <i>A. hydrophila</i> Patogen.....	50
4.6.1 Analisis hasil multipleks <i>PCR</i> secara <i>in silico</i> dan <i>in vitro</i> .....	50
4.6.2 Analisis perbandingan primer multipleks secara <i>in silico</i> .....	51
<b>BAB V SIMPULAN, IMPLIKASI DAN REKOMENDASI.....</b>	<b>54</b>
5.1 Simpulan.....	54
5.2 Implikasi.....	54
5.3 Rekomendasi.....	55
5.4 Hambatan Penelitian.....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>56</b>

<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>63</b>
<b>RIWAYAT HIDUP.....</b>	<b>87</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Nilai Kemurnian dan Konsentrasi Isolat Bakteri menggunakan <i>Genesys 10uv Scanning (Thermo Scientific)</i> .....	26
4.2 Primer untuk Amplifikasi Gen-Gen Faktor Virulen pada <i>Aeromonas</i> sp...	28
4.3 Optimalisasi Kontrol Positif Protokol <i>Single-PCR</i> .....	31
4.4 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>act</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	32
4.5 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>ast</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	33
4.6 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>alt</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	33
4.7 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>pla/lip</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	33
4.8 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>aerA</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	34
4.9 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>ahyB</i> Pustaka pada Laman Primer BLAST NCBI.....	34
4.10 Data Nomor Akses dan Ukuran Sekuen Gen pada Perancangan Primer Multipleks Virulen Spesifik <i>A. hydrophila</i> Patogen.....	41
4.11 Desain Primer Gen Virulen <i>A. hydrophila</i> .....	42
4.12 Hasil Analisa Struktur Sekunder, Persentase GC serta Nilai Tm Primer Multipleks Virulen Spesifik <i>Aeromonas hydrophila</i> Patogen Berdasarkan Primer3.....	43
4.13 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>act</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	44
4.14 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>ast</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	45
4.15 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>alt</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	45
4.16 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>pla/lip</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	46

4.17 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>aerA</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	46
4.18 Hasil Uji Homologi BLAST Gen <i>ahyB</i> pada Laman Primer BLAST NCBI.....	47
4.19 Perbandingan Hasil Pengujian Multipleks PCR secara <i>In silico</i> dan <i>In vitro</i> .....	51
4.20 Perbandingan Primer Gen Virulen Multipleks Pustaka dengan yang Dirancang pada Pengujian Multipleks PCR secara <i>In silico</i> .....	52

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	6
2.2 Multipleks PCR.....	11
2.3 Pengujian DNA secara kuantitatif.....	14
2.4 Ilustrasi elektroforesis.....	15
2.5 Skematik proses elektroforesis gel agarosa.....	15
3.1 Rumus perhitungan kemurnian dan konsentrasi DNA.....	19
3.2 Diagram alur penelitian.....	24
4.1 Hasil elektroforesis isolasi DNA bakteri dengan 16s rRNA.....	27
4.2 Hasil amplifikasi gen virulen kontrol positif <i>single PCR</i> .....	30
4.3 Hasil pengujian nilai $\Delta G$ tiap primer pustaka.....	35
4.4 Hasil pengujian <i>thresholding</i> $\Delta G$ tiap primer pustaka.....	36
4.5 Hasil amplifikasi multipleks PCR secara <i>in silico</i> dengan primer pustaka..	37
4.6 Hasil optimalisasi protokol <i>two tube mPCR</i> .....	39
4.7 Hasil optimalisasi suhu <i>annealing</i> mPCR-2.....	40
4.8 Hasil pengujian nilai $\Delta G$ tiap primer.....	48
4.9 Hasil pengujian <i>thresholding</i> $\Delta G$ tiap primer.....	49
4.10 Hasil amplifikasi multipleks <i>PCR</i> secara <i>in silico</i> .....	50
4.11 Grafik perbandingan uji homologi primer multipleks pustaka dengan primer multipleks yang dirancang.....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Daftar Alat dan Bahan Penelitian.....	63
Lampiran 2. Protokol Pembuatan Larutan Stok.....	67
Lampiran 3. Pedoman Standar <i>Running</i> Protokol <i>Multiplex</i> PCR.....	69
Lampiran 4. Dokumentasi Isolasi dan Subkultur Sampel Bakteri pada Penelitian.....	70
Lampiran 5. Perancangan Primer Gen Virulen <i>Aeromonas hydrophila</i> Menggunakan Primer 3.....	72
Lampiran 6. Daftar Keterangan Sikuen pada Penelitian yang Diperoleh pada Laman NCBI.....	77

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. & Liviawaty, E. (2005). *Pakan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Alfandary, R. (2015). *4 Tips for Efficient Primer Design*. [Online]. Diakses dari <http://www.genomecompiler.com/tips-for-efficient-primer-design/>.
- Angka, S.L., Priosoeryanto, B.P., Lay, B.W., & Harris, E. (2004). *Penyakit motile aeromonad septicemia pada ikan lele dumbo*. Forum Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Beaz-Hidalgo, & R. Figueras, M.J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish Dis.* 36, 371–388.
- Bowden, C. (1985). *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*. [Online]. Diakses dari [http://www.insdc.org/documents/feature\\_table.html#7.4.1](http://www.insdc.org/documents/feature_table.html#7.4.1).
- Bravo, A. F., & Figueras, M. J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* MDPI. 8(1) 129. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>.
- Chaco'n, M. R., Soler, L., Groisman, E. A., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1285-7.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, Wayne M., & Higuchi R., (1994). Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA, USA, Proc. Natl. Acad. Sci Vol.9. pp. 5695-5699.
- Chopra, A. K., Xu, X.-J., Ribardo, D., Gonzales, M., Kuhl, K., Peterson, J. W., & Houston, C. W. (2000). The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* Induces Proinflammatory Cytokine Production and Activates Arachidonic Acid Metabolism in Macrophages. *Infection and Immunity*, 68(5), 2808-2818.
- Chopra, A., & Houston, C. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect* 1:1129-1137.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. 17(4): 840-62.
- Dwiyitno, D. (2010). Pathogenic bacteria, fish, DNA molecular, PCR, *Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 5(2).
- Edwards, M.C., & Gibbs, R.A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications. *Cold Spring Harbor Laboratory* 3: 65-75.



- Eka, G. S. P. (2010). *Characteristics microsatellite genomic in Osphronemus gouramy*. B. Sc. Thesis. Department of Biology Indonesia University of Education.
- EPA Office of Water. (2006). *Aeromonas: Human Health Criteria Document. Health and ecological criteria division office of science and technology office of water U. S. Environmental Protection Agency Washington*.
- Fashier, J. & Petter, C. (2011). *BLAST Glossary*. United States: The national library of medicine.
- Fatchiyah, Arumingtyas, E.L., Widyarti, S., & Rahayu, S. (2009). *Dasar-Dasar Analisa Biologi Molekuler*. Brawijaya Press. Malang.
- Fatchiyah, E.L.A., Sri, W., & Sri, R. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analitis*. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Geneious. (2018). *Primer Design Tutorial*. [Online]. Diakses dari [https://www.geneious.com/web-tutorials/primer-design-tutorial/#Exercise\\_4](https://www.geneious.com/web-tutorials/primer-design-tutorial/#Exercise_4).
- Ghufran, M. H., & Kordi, K. (2004). *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. PT. Rineka Cipta dan PT. Bina Adiaksara. Jakarta.
- Gorron, E., Fausto, R., Diana, B., Luis, M.R.R., Andriana, B., Silvia, R. & Joe, T. (2010). A New Method for Deigning Degenerate Primers and its Use in the Identification of Sequences in Brachiaria Showing Similarity to Apomixis-Associated Genes. *Bioinformatics Aplications Note*, 26(16): 2053-2054. doi: 10.1093/bioinformatics/btq312.
- Hamzah, P. (2014). *Evaluasi Marka Simple Sequence Repeat (SSR) untuk Identifikasi Genotip Klon Karet (Hevea brasiliensis)*. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor.
- Handayani, E., Ramdani, N., Zulfajri, & Yasin, M. (2017). *Makalah Bioteknologi Molekuler: Teknik Manipulasi, Rekombinasi, dan Uji Kualitatif/Kuantitatif DNA*. Departemen Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Handoyo, D., & Rudiretna, A., (2001). Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase chain Reacion (PCR), *Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Surabaya*, Vol.9, No.1, Hal. 17-29.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511.
- Hogg, K. (2016). *A Primer for Designing Degenerate Primers*. [Online]. Diakses dari <https://bitesizebio.com/18992/a-primer-for-designing-degenerate-primers/>.

- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. William & Wilkins. Departement of Microbiology, Gltner Hall, Michigan State University, East lansing, MI, USA, 48824-1101.
- Hussain, I.A., Jeyasekaran, G., Shakila, R.J., Raj, K.T. & Jeevithan, E. (2014). Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* along with other *Aeromonas* spp. from fish and fishery products by multiplex PCR. *J Food Sci Technol* 51: 401–407.
- Illanchezian, S., Jayaraman, S. K., Manoharan, M. S. & Valsalam, S. (2010). Virulence and cytotoxicity of seafood borne *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 978-983.
- Irianto, A. (2005). *Patologi Ikan Teleostei*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Iserte, J.A., Stephan, B.I., Goni, S.E., Borio, C.S., Ghiringhelli, P.D. & Lozano, M.E. (2013). Family-specific degenerate Primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Research International*, 2013(38364): 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/383646>.
- Joshi, M. & Deshpande J.D. (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application. International. *Journal of Biomedical Research*, 2(1): 81-97. doi: <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.
- Khan, I.U.H., Cloutier, M., Libby, M., Lapen, D.R., Wilkes, G. & Topp, E. (2017). Enhanced single-tube multiplex PCR assay for detection and identification of six arcobacter species. *J Appl Microbiol* 123: 1522–1532.
- Kim, H., Nana K., KyuHyeon A., JaeHyung K. & Min-Soo K. (2016). MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. *Nucleid Acid Reesearch*, 44: 259-266. doi: 10.1093/nar/gkw380.
- Kingombe, C. I. Bin, D'Aoust, J.-Y., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M., & Kwan, J. (2010). Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Enviromental Microbiology*, 76(2), 425-33.
- Kingombe, C. I. Bin, Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R., & Jemmi, T. (1999). PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in *Aeromonas* spp., *Appl. Envir. Microbiol.*, 65(12), 5293-5302.
- Kusnadi, Peristiwati, Syulasmi, A., Purwianingsih, W., & Rochintaniawati, D. (2003). *MIKROBIOLOGI*. JICA-IMSTEP, FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.

- Kusuma, S.A.F. (2010). *PCR*. Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran. Bandung.
- Kusumawaty, D. (2015). *Pola Distribusi Gen-Gen Virulen pada Aeromonas hydrophila dan Ekspresi Gen-Gen yang Terlibat dalam Sistem Imunitas Bawaan Ikan Gurame (Osphronemus gourami) yang diinfeksi Patogen Paska Pembungkaman dengan ds siRNA MYD88*. Disertasi. Program Studi Doktor Biologi, Institut Teknologi Bandung.
- Kusumawaty, D., Pancoro, A., Aryantha, L. N. P., & Suhandono, S. (2016). Evaluation of identification techniques for the fish pathogens, *Aeromonas hydrophila*, from Indonesia. *Malaysian Journal of Microbiology* Vol. 12(3) 191-198.
- Laili, U. (2007). *Pengaruh Pemberian Ekstrak Temulawak (Curcuma xanthorrhiza roxb) Terhadap Prevalensi dan Kelulushidupan Ikan Mas (Cyprinus carpio) yang Diinfeksi Bakteri Aeromonas hydrophila*. Skripsi. Program Sarjana Sains Universitas Islam Negri Malang.
- Li Y.P., Yang B.S., Wang H., Zia R.X., Wang L., *et al.* (2009). Mitochondrial DNA analysis reveals a low nucleotide diversity of *Caligula japonica* in China. *African Journal Biotechnology*. 8(12): 2707-2712. doi: 10.5897/AJB09.462.
- Li, J., Ni, X. D., Liu, Y. J., & Lu, C. P. (2011). Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual viulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 823-30.
- Liang, N. S., Sereemasapun, A., Patarakul, K., Gaywee, J., Rodkvamtook, W., Srisawat, N., Wacharapplusadee, S., & Hemachudha, T. (2019). Development of multiplex PCR for neglected infectious diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13(7): 1-12. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007440>.
- Mangunwardoyo, W., Ismayasari, R. & Riani, E. (2010). Test pathogenicity and virulence of *Aeromonas hydrophila* Stanier on tilapia (*Oreochromis niloticus* Lin.) through the Koch's postulates. *Jurnal Riset Akuakultur* 5: 245-255.
- Markoulatos P, Siafakas N, & Moncany M. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16: 47-51.
- Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M. (eds.). Springer, New York. pp. 556.

- Massachusetts Institute of Technology. (2015). *Experimental Molecular Genetics*. [Online] Diakses dari: <https://ocw.mit.edu/terms/>.
- Nam, I. Y., & Joh. K. (2007). Rapid Detection of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from a Trout Farm by Hexaplex PCR. *The Journal of Microbiology, The Microbiological Society of Korea*, 45: 4.
- Nugroho, E.d., & Rahayu, D.A. (2016). *Penentuan Praktikum Bioteknologi*. Deepublish. Yogyakarta.
- Oliveira, D. C. & Lencastre, H. D. (2002). Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(7): 2155-2161. doi: [10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2155-2161.2002).
- Ottaviani, D., Parlani C., Cittero B., Massini L., Leoni F., Canonico C., Sabatini L., Bruscolini F. & Pianetti A. (2011). Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology* 144: 538-545.
- Pablos, M., Remacha, M.-A., Rodríguez-Calleja, J.-M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M.-L. (2010). Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(9), 1163–1172. doi:10.1007/s10096-010-0982-3.
- Persson, S., Al-Shuweli, S., Yapici, S., Jensen, J.N. & Olsen, K.E. (2015) Identification of clinical aeromonas species by rpoB and gyrB sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *J Clin Microbiol* 53: 653–656.
- Premier Biosoft. (2020). *PCR Primer Design Guidelines*. [Online]. Diakses dari [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html).
- Prusakova, O.V., Glukhova, X.A., Afanas'eva, G.V., Trizna, Y.A., Nazarova, L.F. & Beletsky, I.P. (2018). A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species. *Meat Sci* 137: 34–40.
- Puthucheary, S. D., Puah, S. M., & Chua, K. H. (2012). Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PloS One*, 7(2), 30205.
- Rahma, S.A. (2018). *Identifikasi Gen Housekeeping Pada Dna Genom Ikan Gurame (Osphronemus gouramy)*. (Skripsi). Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.
- Reith, M.E. Singh, R.K. Curtis, B. Boyd, J.M. Bouevitch, A. Kimball, J. Munholland, J. Murphy, C. Sarty, D. Williams, J. *et al.* (2008). The
- Siti Triani Rakhmirianti, 2020  
**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**  
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: Insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genom.*, 9, 427.

Rodriguez PH, & Ramirez AG. (2012). Polymerase Chain Reaction. Croatia: Dalam: *Tech Europe*. Hlm. 159.

Sarono, A., K.H. Kamiso, I.W.Y.B., Lelono, Widodo, N. Thaib, E.B.S., Haryani, S. Hariyanto, Triyanto, Ustadi, A.N. Kusumahati, W. Novianti, Wardani, & S., Setaningsih. (1993). *Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri, buku 2*. Kerjasama Pusat Karantina Pertanian dan Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan UGM. Yogyakarta.

Scoaris, D. de O., Colacite, J., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B. A., & Dias Filho, B. P. (2008). Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas spp.* Isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(1-2), 111-22.

Sen, K., & Rodgers, M. (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1077-86.

Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., *et al.* (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of all trades. *J. Bacteriol.* 188, 8272–8282.

Sha, J., Kozlova, E. V., & Chopra, A. K. (2002). Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*, 70(4), 1924-35.

Silas, S. Brown, Yun-Wen, C., Ming, W., Alexandra, C., Eguzkine, O., & Ming-Qing, D. (2017). PrimerPooler: automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. *Biology Methods and Protocols*. Oxford University Press. 2(1). doi:[10.1093/biomethods/bpx006](https://doi.org/10.1093/biomethods/bpx006)

Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*. 3(5): 898-905. doi: [10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x](https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x).

Soler, L., Yanez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalan, V., Figueras M. J. & Martinez-Murcia A. J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1511-1519.

Sugiono. (2015). *Manajemen penelitian*. Rineka Cipta. Jakarta.

Swaminathan, T. R., Rathore, G., Abidi, R., & Kapoor, D. (2004). Detection of *Aeromonas hydrophila* by Polymerase Chain Reaction. *Indian J. Fish.* 51: 251-254.

Siti Triani Rakhmirianti, 2020

**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

- Thornton, B & Chhandak B. (2011). Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, 39(2): 145-154. doi: 10.1002/bmb.20461.
- Timpe, J. M., Holm, M. M., Vanlerberg, S. L., Basrur, V., & Lafontaine, E. R. (2003). Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesion and lipolytic activities. *Infection and Immunity*, 71(8), 4341-50.
- Tomás, J.M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–22.
- Triyaningsih, Sarjito, & Prayitno, S. B. (2014). Pathogenicity *Aeromonas hydrophila* isolated from catfish (*Clarias gariepinus*) from Boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology* 3(2), 11-17.
- Triyanto. (1990). *Patogenitas Beberapa Isolat Aeromonas hydrophila terhadap Ikan Lele (Clarias batrachus L.)*. Prosiding Seminar II Penyakit Ikan dan Udang. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Hal. 116-122.
- Tsai, Y. H., Chen, P. H., Yu, P. A., Chen, C. L., Kuo, L. T., & Huang, K. C. (2019). A multiplex PCR assay for detection of *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae* from the isolates of patients with necrotizing fasciitis. *International Journal of Infectious Diseases*. 81: 73-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.037>.
- Untergasser, A., Harm N., Xiangyu R., Ton B., Rene G. & Jack A.M.L. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(2): 1-4. doi:10.1093/nar/gkm306.
- Vilches, S., Jimenez, N., Toma's, J. M., & Merino, S. (2009). *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6382-92.
- Xiong, J., Huang, B., Guo, S. L., Xu, J. S., & Huang, W. (2019). A Novel multiplex PCR assay for rapid detection of virulent *Aeromonas* in cultured eels. *Journal of Applied Microbiology* 127: 418-428. doi: 10.1111/jam.14311
- Yilmaz, M., Ozic, C. & Gok, I. (2012). Gel Electrophoresis Principal & Basics. *Intech*: Croatia.
- Yulianti, T. (2019). *Isolasi dan Identifikasi Housekeeping Gene pada Ikan Sidat (Anguilla bicolor)*. Skripsi. Program Studi Biologi FPMIPA UPI.
- Zhang, D.F., Zhang, Q.Q. & Li, A.H. (2014). Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol* 59: 471–478.

Siti Triani Rakhmirianti, 2020

**DESAIN DAN OPTIMASI PRIMER MULTIPLEKS UNTUK DETEKSI EFEKTIF BAKTERI *Aeromonas hydrophila* PATOGEN**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu